

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/30983 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: 16/38, A61K 38/57, A61P 31/04

C07K 14/81,

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11994

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 2001 (11.10.2001)

Deutsch

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

(30) Angaben zur Priorität:

100 50 665.8 13. Oktober 2000 (13.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): OCTAPHARMA AG [CH/CH]; Seidenstrasse 2, CH-8853 Lachen (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOSIC, Djuro [DE/AT]; Oberlaaer Strasse 235, A-1100 Wien (AT).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PLASMA FRACTION CONTAINING BIKUNIN, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND USE OF THE SAME

A2

(54) Bezeichnung: BIKUNIN ENTHALTENDE PLASMAFRAKTION, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE RER VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a bikunin plasma fraction having antitrypsin activity. A source containing the bikunin plasma fraction is separated into components by means of molecular exclusion chromatography and a fraction having antitrypsin activity is collected.

WO 02/30983

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung einer Bikunin-Plasmafraktion mit Antitrypsin Aktivität, wobei eine die Bikunin-Plasmafraktion enthaltende Quelle mittels Molekularausschluss-Chromatographie in Komponenten getrennt wird und eine Fraktion mit Antitrypsin Aktivität gesammelt wird.

Bikunin enthaltende Plasmafraktion,
Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Bikunin-enthaltenden Plasmafraktion, das erhältliche Produkt sowie dessen Verwendung bei septischen Zuständen.

Bikunin ist ein Proteinase Inhibitor mit einer Reihe von physiologischen Funktionen. Es liegt in Plasma zumeist als Untereinheit von Prä- und Inter- α -Trypsininhibitor ($I\alpha I$) vor. In der gebundenen Form wird jedoch eine geringere Bikunin-Aktivität als in der freien Form gefunden. Zu den vielfältigen Aktivitäten des Bikunin zählt auch die Inhibition des Plasmin an der Zelloberfläche sowie die Stimulation von Neutrophilen durch Lipopolysaccharide, was auf eine Rolle bei Entzündungsreaktionen hindeutet. In "The International Journal of Biochemistry Cell Biology" 32, 125-137 (2000) wird die Struktur und Funktion von Bikunin diskutiert.

Das Bikunin wird oftmals als leichte Kette des $I\alpha I$ bezeichnet bzw. als dessen Untereinheit 1. Man spricht auch von der $I\alpha I$ Familie der Plasma Proteine, die aus verschiedenen strukturell verwandten Molekülen besteht. Eine Übersicht dazu wird von J.P. Salier et al (Biochem. J. 315, 1-9 (1996)) vorgestellt. Bikunin wird zur Bildung von $I\alpha I$ mit verschiedenen schweren (H) Ketten durch kovalente Bindung integriert. Dabei wird über Chondroitin-4-Sulfat eine Protein Glycosaminoglycan - Protein Bindung gebildet.

Zur therapeutischen Verwendung bei schweren Entzündungen wird in der US-A-5,777,081 ein Inter- α -Trypsininhibitor Konzentrat beschrieben, welches aus drei Peptidketten besteht und ein Molekulargewicht von etwa 220 kD aufweist. Dieses Molekül besteht aus den zwei schweren Ketten H1 und H2, sowie der leichten Kette, Bikunin, gebunden durch eine Glycosaminoglycan-Kette. Zur Gewinnung des Konzentrates wird eine Heparin-Affinitätschromatographie herangezogen.

- 2 -

Das der Erfindung zu Grunde liegende technische Problem liegt in der Bereitstellung einer Plasmafraktion mit Antitrypsin Aktivität, die sich durch ein einfaches Herstellungsverfahren sowie die Wirksamkeit bei septischen Zuständen auszeichnet.

5 Dieses Problem wird erfindungsgemäß durch ein neues Herstellungsverfahren für eine humane Bikunin-Plasmafraktion gelöst. Aufgrund des Bikunin-Gehalts weist diese Plasmafraktion eine Antitrypsin Aktivität auf. Es hat sich herausgestellt, dass sich zur Gewinnung der Bikunin-Plasmafraktion die Molekularausschluss-Chromatographie hervorragend eignet. Damit kann eine Vielfalt von
10 Proteinen der $\text{l}\alpha\text{l}$ Familie gemeinsam erhalten werden. Darunter ist auch der native Inter- α -Trypsininhibitor, der in Plasma oftmals vergesellschaftet mit weiteren Bikunin-enthaltenden hochmolekularen Proteinen gefunden wird. Ebenso ist auch ein reiner Inter- α -Trypsininhibitor mit dem erfindungsgemäßigen Verfahren erhältlich, der im wesentlichen nur aus dem Molekül mit den
15 drei peptidischen Ketten besteht (H1, H2 und Bikunin), gebunden durch eine Glycosaminoglycan-Kette, und ein Molekulargewicht von etwa 220 kDa aufweist. Freies ungebundenes Bikunin hat ein Molekulargewicht von unter 70 kDa und wird in einfacher Weise durch das erfindungsgemäße Verfahren abgetrennt. Es ist durch die Molekularausschluss-Chromatographie, auch genannt Gelpermeation, jedenfalls möglich die Bikunin-enthaltenden Proteine in
20 einer Fraktion enthaltend Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 100 bis 500 kDa, vorzugsweise 100 bis 250 kDa, zu erhalten, die im wesentlichen frei von ungebundenem Bikunin sind.

25 Das freie ungebundene Bikunin hat nämlich den Nachteil der kurzen Halbwertszeit von etwa 30 min. Bikunin in der erfindungsgemäßen Plasmafraktion erweist sich in vivo als wesentlich stabiler; es konnte eine Halbwertszeit von mehreren Stunden nachgewiesen werden.

Es war zudem überraschend, dass Bikunin, welches in der erfindungsgemäß hergestellten Plasmafraktion in gebundener Form vorliegt, sich in einem in vivo

- 3 -

Modell als wertvolles Therapeutikum gegen Sepsis zeigt. Man konnte eher annehmen, dass das freie ungebundene Bikunin stärker wirksam wäre.

Die Herstellung durch Molekularausschluss-Chromatographie ist einerseits direkt aus Plasma möglich oder aus einer Plasmafraktion, also beispielsweise 5 aus Fraktionen, die durch Fällungen oder Adsorptionen aus Humanplasma erhalten werden können. Als vorteilhafterweise verwendetes Startmaterial kann Kryopräzipitat oder Kryoüberstand eingesetzt werden. Die Verwendung von Kryopräzipitat als Ausgangsmaterial zur Herstellung der erfindungsgemäß 10 Bikunin-Plasmafraktion hat den Vorteil, dass bei der Molekularausschluss-Chromatographie neben der Bikunin-Plasmafraktion eine weitere therapeutisch relevante Plasmafraktion enthaltend gereinigten Komplex aus Blutgerinnungsfaktor VIII (FVIII) und von Willebrand Faktor (vWF), also den FVIII/vWF, gewonnen werden kann.

Dabei folgt die Molekularausschluss-Chromatographie vorzugsweise auf eine 15 Reinigung des FVIII/vWF durch Ionenaustauschchromatographie. Die besonders bevorzugte Kombination von Reinigungs- und Herstellungsverfahren ist eine Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung von Plasmaproteinen aus Kryopräzipitat, wie z.B. den FVIII und/oder den vWF, und einer darauffolgenden Gelpermeation. Ebenso bevorzugt ist die Reinigung von Faktoren des 20 Prothrombinkomplex und die Gelpermeation.

Nach Trennung der Bikunin-Plasmafraktion durch Molekularausschluss-Chromatographie können Chromatographieverfahren zur höheren Reinheit der Bikunin enthaltenden Proteine eingesetzt werden. Dazu zählen die Ionenaustausch-, Affinitäts-, Molekularausschluss-Chromatographie und/oder hydrophobe Chromatographie. 25

Diese Verfahren können sich der Säulenchromatographie, als kontinuierliches oder diskontinuierliches Verfahren, in einer Axialsäule oder Radialsäule, oder auch des "Batch" Verfahren bedienen.

Für die Gelpermeation oder Molekularausschluss-Chromatographie werden vorzugsweise Chromatographiematerialien auf Basis von hydrophilen Trägern eingesetzt. Diese sind vorzugsweise Polysaccharide, insbesondere Dextrane, Cellulose, Agarose, modifizierte Polysaccharide, hydrophile, synthetische Polymere, vorzugsweise sogenannte Tentakelgele, mit hydrophilen Gruppen modifizierte Silicagele oder Kombinationen davon. Die Elution der Bikunin-Plasmafraktion erfolgt vornehmlich mit Puffern erhöhter Salzkonzentration in einem pH-Bereich von etwa 6 bis 9.

Als kommerziell erhältliche Träger werden beispielsweise Polysaccharide, wie Sephadex, Sepharose, Agarose, etc. eingesetzt. Bevorzugte synthetische Polymere sind solche auf Polyglycidylmethacrylat-Basis, insbesondere mit hydrophilen Armen (Tentakeln) modifizierte. Zur weiteren Beschreibung wird auf die EP-A-0 337 144 und die EP-A-0 320 023 verwiesen. Als Tentakel-Chromatographiematerialien sind insbesondere die Trägermaterialien aus der EP-A-0 377 144 bevorzugt. Neben den organischen Trägermaterialien kommen auch anorganische Materialien, wie Silicagele in Betracht. Hier sind beispielsweise TSK-Gele sowie sogenannte SW-Gele (Silica wide pore, Toso Haas, Stuttgart) zu nennen.

Das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Trägermaterial weist insbesondere eine großporige Struktur auf. Partikuläres Material besitzt insbesondere eine Korngröße von 0,5 bis 350 µm.

Ebenfalls Verwendung finden können sogenannte kompakte Blockmaterialien, Membranen und/oder Monolithen, wie sie in der EP-A-0 320 023 beschrieben sind. Das kompakte Blockmaterial hat den Vorteil, dass es aufgrund seiner monolithischen Struktur druckstabil ist und im radialen Fluss bzw. im kontinuierlichen Verfahren betrieben werden kann. Die Prozessdauer wird dadurch wesentlich herabgesetzt, was den Vorteil hat, dass ein labiles Protein, wie der IgG unter Umständen auch ohne Verwendung von Prozessstabilisatoren gereinigt werden kann, und der native Zustand im wesentlichen erhalten wird. Die

- 5 -

rasche chromatographische Trennung an derartigen Materialien wird auch im kleinen Maßstab ausgenutzt, es wird daher das erfindungsgemäße Verfahren nicht nur für den großtechnischen, industriellen Einsatz zur Verfügung gestellt, sondern auch für die Analytik, z.B. im Rahmen einer Prozess-Kontrolle während der Produktion von Plasmafraktionen.

Die Porengröße des Trägermaterials ist üblicherweise im Bereich von 5 nm bis 10 µm, insbesondere größer als 50 µm.

Für die weitere chromatographische Reinigung werden etwa Ionenaustauscher auf organischer oder anorganischer Basis, also Kationen- oder Anionenaustauscher, eingesetzt. Als starke Kationenaustauscher sollen beispielhaft Träger mit SO₃-Gruppen und als schwache Carboxymethyl-Kationenaustauscher genannt werden. Zu den möglicherweise verwendeten starken Anionenaustauschern zählen etwa die mit TMAE-, oder QA-Gruppen versehenen Gele; zu den starken Anionenaustauscher etwa diejenigen mit DEAE-Gruppen. Im Allgemeinen können etwa Tentakelgele oder auch Membranen eingesetzt werden.

Ebenso können auch Affinitätsmaterialien mit verschiedenen Liganden, etwa Heparine, Dextransulfate, Hydroxyapatite, Lektine, Rezeptoren und niedermolekulare Substanzen mit Affinität zu Iαl bzw. Bikunin zur Anwendung kommen. Zur hydrophoben Chromatographie werden etwa Träger eingesetzt, die mit linearen Kohlenwasserstoffen mit C1 bis C10 oder deren Derivate, darunter Phenylgruppen und dergleichen, modifiziert sind.

Ein besonders geeignetes erfindungsgemäßes Verfahren bedient sich der Immunaffinitätschromatographie unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Bikunin. Damit werden Moleküle, die Bikunin gebunden haben, weiter angereichert. Ein bevorzugter monoklonaler Antikörper ist ein Maus-Antikörper, der gegen ein Epitop im aktiven Zentrum von Bikunin gerichtet ist. Ein solcher Antikörper, wie z.B. der Mab 69.31, blockiert insbesondere die Plasmin inhibierende Wirkung der leichten Kette von Iαl.

Der monoklonale Antikörper, der an die Bikunin-enthaltenden Proteine der λ_1 Familie bindet eignet sich besonders für die Herstellung und weitere Reinigung der erfindungsgemäßen Bikunin-Plasmafraktion. Dieser ist dann vorteilhafteweise an einem festen Träger immobilisiert, zum Einsatz in der Säulenchromatographie, für ein kontinuierliches oder diskontinuierliches Verfahren, in einer Axialsäule oder Radialsäule, oder auch im "Batch" Verfahren. Dabei ist unumgänglich, dass der Antikörper auch nach seiner Immobilisierung noch eine ausreichende Affinität zu Inter- α -Trypsininhibitor zeigt.

Weiterhin können auch polyklonale Antikörper durch Immunisierung von geeigneten Systemen mit der erfindungsgemäßen Bikunin-Plasmafraktion erhalten werden. Die Analyse der Bikunin-Plasmafraktion mittels elektrophoretischer und immunchemischer Methoden zeigt eine Reihe von Bikunin-enthaltenden Proteinen, jedenfalls solche, die Bikunin an mindestens eine schwere Kette des λ_1 assoziiert enthalten. Freies Bikunin konnte nicht gefunden werden. Die erfindungsgemäß gewonnene Bikunin-Plasmafraktion oder λ_1 Plasmafraktion ist somit im wesentlichen frei von ungebundenem, separatem Bikunin.

Nachdem die Antitrypsin Aktivität der Bikunin Untereinheit der Proteine zugeordnet wird, kann die erfindungsgemäße Bikunin-Plasmafraktion auch dadurch gekennzeichnet werden, dass sie zum Großteil aus Proteinen besteht, die eine Antitrypsin Aktivität aufweisen. Eine bevorzugte Plasmafraktion enthält daher mindestens zu 70% Proteine mit einer Antitrypsin Aktivität, vorzugsweise mindestens 80%, am meisten bevorzugt mindestens 90%.

Speziell durch weitere Reinigungsschritte kann auch eine spezifische Aktivität, ausgedrückt in Trypsin inhibierenden Einheiten pro Milligramm Protein, die ein Vielfaches der Aktivität von Humanplasma beträgt. Beispielsweise kann die Antitrypsin-Aktivität mindestens 50 mal mehr als in Plasma erreicht werden, vorzugsweise mehr als 100 mal, am meisten bevorzugt mehr als 200 mal soviel als in Humanplasma. Es wurde auch überraschenderweise gefunden, dass

- 7 -

mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ein derart Protein schonendes Verfahren bereitgestellt wird, so dass die erhaltene Bikunin-Plasmafraktion weitgehend natives, gebundenes Bikunin bzw. natives Inter-alpha-Trypsininhibitor enthält. So ist die erhaltene Aktivität bezogen auf Inter-alpha-Trypsininhibitor Protein, gemessen als Antigen, mit der Aktivität in Humanplasma durchaus vergleichbar. Die erfindungsgemäße Plasmafraktion enthält also vorzugsweise Bikunin enthaltende Proteine, wie Inter-alpha-Trypsininhibitor, die zumindest 80% aktiv sind, vorzugsweise mindestens 90%. Am meisten bevorzugt ist das Verhältnis der Aktivität zu Antigen etwa gleich.

Die im erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren eingesetzte Molekularausschluss-Chromatographie ist Voraussetzung für die Charakterisierung des Molekulargewichtes der enthaltenden Proteine. Eine bevorzugte Plasmafraktion enthält im wesentlichen Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht im Bereich von 100 kDa bis 500 kDa, vorzugsweise 100 bis 250 kDa, und sollte darüber hinaus keine weiteren wesentlichen Bestandteile enthalten. Das scheinbare Molekulargewicht wird durch die Molekularausschluss-Chromatographie bestimmt, wobei Standardproteine mit einem bestimmten Molekulargewicht als Referenzmaterial eingesetzt werden.

Die in der erfindungsgemäßen Plasmafraktion vorwiegend enthaltenen Proteine der $\lambda\alpha\lambda$ Familie sind der Inter-alpha-Trypsininhibitor selbst und vorzugsweise mindestens ein weiteres Bikunin enthaltendes hochmolekulares Protein, also mit einem scheinbaren Molekulargewicht von mindestens 100 kDa wie der Prä-alpha-Inhibitor. Aber auch eine hochgereinigte $\lambda\alpha\lambda$ -Präparation kann durch das erfindungsgemäße Verfahren ohne weiteres erhalten werden, wobei die resultierende erfindungsgemäße Plasmafraktion bzw. $\lambda\alpha\lambda$ -Präparation keinen weiteren Bikunin-enthaltenden Bestandteil enthält, insbesondere im wesentlichen frei ist von separatem Bikunin. "Im wesentlichen frei" bedeutet hier weniger als 10%, vorzugsweise weniger als 5% bezogen auf das Gesamtprotein.

- Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird die Bikunin-Plasmafraktion als Basis für eine pharmazeutische Zubereitung eingesetzt. Diese ist durch die gegebenenfalls weitere Reinigung der Bikunin-Proteine und durch Formulierung, Maßnahmen zur Sterilisierung bzw. Sterilfiltration sowie Inaktivierung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen erhältlich. Vorzugsweise wird die pharmazeutische Präparation als Lyophilisat zur Verfügung gestellt, beispielsweise formuliert mit stabilisierenden Polyolen, Zucker, Zuckeralkoholen, Aminosäuren oder anorganischen Salzen, welche Formulierung für die intravenöse Verabreichung geeignet ist.
- Die pharmazeutische Anwendung von Plasmaprodukten birgt ein Risiko der Übertragung von möglicherweise im Ausgangsplasma vorhandenen Pathogenen, wie z.B. von durch Blut übertragbare Viren mit sich. Dazu zählen die Hepatitisviren A, B, C, die HI-Viren und Parvovirus. Um das Risiko zu mindern, werden daher bei der Herstellung der Plasmaderivate verschiedene Maßnahmen zur Reduktion von möglicherweise vorhandenen Viren durch Inaktivierung oder Abreicherung bzw. Entfernung eingesetzt. Zur Inaktivierung von Viren wird etwa die Hitzebehandlung in wässriger Lösung oder im Lyophilisat eingesetzt, wobei das Erhitzen vorzugsweise des gereinigten Produktes ("bulk") oder im Endbehälter vorgenommen wird. Dabei können Stabilisatoren wie anorganische Salze, Zucker, Zuckeralkohole, Polyole im allgemeinen oder Aminosäuren einen vorteilhaften Effekt zum Erhalt der Bikunin-Aktivität zeigen. Weiter ist die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, etwa mit TNBP (Tri-n-Butylphosphat), gegebenenfalls in Anwesenheit von Detergenzien, oder Tensiden, wie Triton, Tween, Cholat, und dergleichen, eine bevorzugte Maßnahme zur Inaktivierung von Viren. Weitere Methoden sehen verschiedene Chemikalien, wie z.B. Thiocyanate, Monochloressigsäure oder organische Säuren vor. Auch Alkohole haben eine Virus inaktivierende Wirkung.

Zur Abreicherung bzw. Entfernung von Viren eignet sich insbesondere die Nanofiltration, etwa im cross-flow (tangentialer Fluss) oder im "dead-end"

- 9 -

(Durchfluss) Verfahren. Die dazu verwendeten Filtermaterialien sind einerseits Membranen bzw. Tiefenfilter oder Ultrafilter. Etwa werden Filter mit einer Porengröße im Bereich von 15 bis 30 nm eingesetzt.

Die Testung der therapeutischen Einsetzbarkeit der erfindungsgemäßen Plasmafraktion oder pharmazeutischen Zubereitung erfolgt vorerst in geeigneten Tiermodellen. Als anerkanntes Modell wurde etwa ein Rattenmodell der polymikrobiellen Sepsis (vergleiche Yang S. et al, Am. J- Physiol 277, H1036-H1044 (1999) and Wang P, et al, J- Surg. Res. 85, 59-65 (1999)) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die erfindungsgemäße Bikunin-Plasmafraktion mit einer Dosis von beispielsweise 30 mg/kg die Mortalität der Tiere signifikant herabsetzte. Die therapeutische Dosis wird etwa im Bereich von 3 bis 300 mg/kg vermutet, je nach Grad der Sepsis und des Zeitpunktes der Verabreichung.

Eine erfindungsgemäße Verwendung der Bikunin-Plasmafraktion oder der pharmazeutischen Zubereitung, vor allem derjenigen, die im wesentlichen aus den Proteinen besteht, die ein scheinbares bzw. auch durch andere Methoden als die Gelpermeation verifiziertes Molekulargewicht von 100 bis 500 kDa aufweisen, zur Behandlung von septischen Zuständen, umfassend schwere entzündliche Prozesse im Rahmen einer Sepsis oder septischen Schock, ist daher ein weiterer vielversprechender Gegenstand der Erfindung.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele noch weiter beschrieben.

1. Herstellung der Bikunin-Plasmafraktion

Plasma-Kryopräzipitat wurde mit TNBP und Triton zur Inaktivierung von Viren behandelt. Anschließend wurde das Gemisch über den Anionenaustauscher EMD - TMAE - Sephadex, einem Tentakelgel, aufgetrennt, wobei eine Fraktion enthaltend den Faktor VIII sowie den vWF gewonnen wurde. Diese Fraktion wurde weiter aufgetrennt unter Einsatz der Molekularausschluss-Chromatographie an Superose 6 (Pharmacia). Die hochmolekulare Fraktion

- 10 -

enthaltende vWF und den FVIII/vWF Komplex wurde abgetrennt und die Fraktion enthaltend Moleküle mit dem scheinbaren Molekulargewicht im Bereich von 100 bis 500 kDa wurde gewonnen.

Nach elektrophoretischer Analyse und immunchemischer Auswertung konnte
5 nachgewiesen werden, dass 80% der Proteine dieser Plasmafraktion der Famili-
e des λ mit Bikunin Aktivität zuzuordnen ist.

2. Reinigung der Bikunin-Plasmafraktion durch Immunaffinitätschromatographie

Ein Maus-monoklonaler Antikörper Mab 69.31, hergestellt auf Basis einer ge-
reinigten Plasmafraktion aus Beispiel 1, mit inhibierender Wirkung gegen die
10 Bikunin-Aktivität, wurde mit konventionellen Methoden hergestellt und selek-
tioniert. Dieser Antikörper wurde an einem Träger, geeignet zur Immunaffini-
tätschromatographie, immobilisiert. Eine Bikunin-Plasmafraktion konnte damit
aus den folgenden Quellen isoliert werden: Humanes Plasma, Plasma-
Kryopräzipitat, über Ionenaustauscher gereinigtes Plasma-Kryopräzipitat sowie
15 die Bikunin-Plasmafraktion aus Beispiel 1 zum Erhalt einer weiter gereinigten
Fraktion.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Bikunin-Plasmafraktion mit Antitrypsin Aktivität, wobei eine die Bikunin-Plasmafraktion enthaltende Quelle mittels Molekularausschluss-Chromatographie in Komponenten getrennt wird und eine
5 Fraktion mit Antitrypsin Aktivität gesammelt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bikunin-Plasmafraktion enthaltende Quelle Kryopräzipitat oder Kryoüberstand ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei in der Bikunin-
10 Plasmafraktion vorhandene Proteine ein Molekulargewicht von 100 bis 500 kDa aufweisen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bikunin-Plasmafraktion durch Immunaffinitäts-Chromatographie unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Bikunin weiter gereinigt wird.
15
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bikunin-Plasmafraktion durch Ionenaustausch-, Affinitäts-, Molekularauschluss-Chromatographie und/oder hydrophober Chromatographie weiter gereinigt wird.
20
6. Humane Bikunin-Plasmafraktion erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 5, welche das Bikunin assoziiert mit mindestens einer schweren Kette von Inter- α -Trypsininhibitor enthält, im wesentlichen frei von freiem Bikunin.
25
7. Bikunin-Plasmafraktion nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 70% der Proteine eine Antitrypsin-Aktivität aufweisen.
8. Bikunin-Plasmafraktion nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 90% der Proteine eine Antitrypsin-Aktivität aufweisen.

- 12 -

9. Bikunin-Plasmafraktion nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass die spezifische Antitrypsin-Aktivität mindestens 50 mal höher als in Humanplasma ist.
10. Bikunin-Plasmafraktion nach einem der Ansprüche 6 bis 9, mit Proteinen, die ein scheinbares Molekulargewicht von 100 bis 500 kDa aufweisen.
5
11. Bikunin-Plasmafraktion nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie Inter- α -Trypsininhibitor enthält.
12. Bikunin-Plasmafraktion nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie Inter- α -Trypsininhibitor und mindestens ein weiteres Bikunin enthaltendes
10 hochmolekulares Protein enthält.
13. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend eine Bikunin-Plasmafraktion nach einem der Ansprüche 6 bis 12.
14. Antikörper, erhältlich durch Immunisierung von geeigneten Systemen mit einer Bikunin-Plasmafraktion nach einem der Ansprüche 6 bis 12.
15
15. Träger mit einem Antikörper nach Anspruch 14, der eine Affinität zu Inter- α - Trypsininhibitor aufweist.
16. Träger mit einem monoklonalen Antikörper gerichtet gegen Bikunin, der zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 4 geeignet ist..
20
17. Verwendung einer Bikunin-Plasmafraktion nach einem der Ansprüche 6 bis 12, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Sepsis.

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/030983 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/81,**
16/38, A61K 38/57, A61P 31/04

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/11994

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 2001 (11.10.2001)

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 100 50 665.8 13. Oktober 2000 (13.10.2000) DE

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:** 12. Dezember 2002

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **OCTAPHARMA AG [CH/CH]**; Seidenstrasse 2, CH-8853 Lachen (CH).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JOSIC, Djuro** [DE/AT]; Oberlaaer Strasse 235, A-1100 Wien (AT).

(74) Anwälte: **MEYERS, Hans-Wilhelm** usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

A3

(54) Title: PLASMA FRACTION CONTAINING BIKUNIN, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND USE OF THE SAME

WO 02/030983

(54) Bezeichnung: BIKUNIN ENTHALTENDE PLASMAFRAKTION, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE RER VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a bikunin plasma fraction having antitrypsin activity. A source containing the bikunin plasma fraction is separated into components by means of molecular exclusion chromatography and a fraction having antitrypsin activity is collected.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung einer Bikunin-Plasmafraktion mit Antitrypsin Aktivität, wobei eine die Bikunin-Plasmafraktion enthaltende Quelle mittels Molekularausschluss-Chromatographie in Komponenten getrennt wird und eine Fraktion mit Antitrypsin Aktivität gesammelt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/11994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/81 C07K16/38 A61K38/57 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOSIC ET AL: "Size-exclusion chromatography of plasma proteins with high molecular masses" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 796, no. 2, 20 February 1998 (1998-02-20), pages 289-298, XP004110809 ISSN: 0021-9673 see pages 289-90 (Einleitung) and 296-97 (Diskussion) * ---	1-17
Y	US 5 777 081 A (MICHALSKI ET AL) 7 July 1998 (1998-07-07) cited in the application see column 2-3 --- -/-	1-17

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2002

Date of mailing of the international search report

24/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Korsner, S-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11994

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ATMANI ET AL: "Role of inter-alpha-inhibitor and its related proteins in urolithiasis. Purification of an inter-alpha-inhibitor related protein from the bovine kidney." UROLOGICAL RESEARCH, vol. 27, 1999, pages 57-61, XP000994523 see page 58 ("Protein isolation") * ---	1-17
A	US 5 846 763 A (LEE ET AL) 8 December 1998 (1998-12-08) see column 55, lines 1-10 and column 59, lines 33-62 -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/11994

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 5777081	A	07-07-1998	FR AT AU CA DE DE DK EP WO JP PT	2711371 A1 213252 T 7996294 A 2174231 A1 69429868 D1 69429868 T2 724600 T3 0724600 A1 9511260 A1 9503775 T 724600 T		28-04-1995 15-02-2002 08-05-1995 27-04-1995 21-03-2002 19-09-2002 27-05-2002 07-08-1996 27-04-1995 15-04-1997 31-07-2002
US 5846763	A	08-12-1998	US US US AT AU DE DE EP JP WO	5386013 A 6210905 B1 2002090708 A1 185573 T 1228892 A 69230136 D1 69230136 T2 0567575 A1 6504912 T 9212175 A1		31-01-1995 03-04-2001 11-07-2002 15-10-1999 17-08-1992 18-11-1999 25-05-2000 03-11-1993 09-06-1994 23-07-1992

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/11994

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
 IPK 7 C07K14/81 C07K16/38 A61K38/57 A61P31/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
Y	JOSIC ET AL: "Size-exclusion chromatography of plasma proteins with high molecular masses" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, Bd. 796, Nr. 2, 20. Februar 1998 (1998-02-20), Seiten 289-298, XP004110809 ISSN: 0021-9673 * Siehe Seiten 289-90 (Einleitung) und 296-97 (Diskussion) *	1-17
Y	US 5 777 081 A (MICHALSKI ET AL) 7. Juli 1998 (1998-07-07) in der Anmeldung erwähnt * Siehe Spalten 2-3 *	1-17 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17. Oktober 2002	24/10/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Korsner, S-E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/11994

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ATMANI ET AL: "Role of inter-alpha-inhibitor and its related proteins in urolithiasis. Purification of an inter-alpha-inhibitor related protein from the bovine kidney." UROLOGICAL RESEARCH, Bd. 27, 1999, Seiten 57-61, XP000994523 * Siehe Seite 58 ("Protein isolation") * -----	1-17
A	US 5 846 763 A (LEE ET AL) 8. Dezember 1998 (1998-12-08) * Siehe Spalte 55, Zeilen 1-10 und Spalte 59, Zeilen 33-62 * -----	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/11994

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5777081	A	07-07-1998	FR AT AU CA DE DE DK EP WO JP PT	2711371 A1 213252 T 7996294 A 2174231 A1 69429868 D1 69429868 T2 724600 T3 0724600 A1 9511260 A1 9503775 T 724600 T		28-04-1995 15-02-2002 08-05-1995 27-04-1995 21-03-2002 19-09-2002 27-05-2002 07-08-1996 27-04-1995 15-04-1997 31-07-2002
US 5846763	A	08-12-1998	US US US AT AU DE DE EP JP WO	5386013 A 6210905 B1 2002090708 A1 185573 T 1228892 A 69230136 D1 69230136 T2 0567575 A1 6504912 T 9212175 A1		31-01-1995 03-04-2001 11-07-2002 15-10-1999 17-08-1992 18-11-1999 25-05-2000 03-11-1993 09-06-1994 23-07-1992